

Die Bestimmung von Natrium, Kalium und Calcium im Harn mit einem Filterflammenphotometer

Von K. M. PIRKE und D. STAMM

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

(Eingegangen am 5. Februar 1970)

Es wird eine Routinemethode zur Messung von Natrium, Kalium und Calcium im Harn beschrieben. Die optimalen Meßbedingungen für ein Filterflammenphotometer wurden ermittelt und ihre Zuverlässigkeit geprüft. Die Proben wurden für die Natrium-Messung 1:400, für die Kalium-Messung 1:200 und für die Calcium-Messung 1:20 verdünnt. Bei der Natrium-Messung tritt eine Ionisationsstörung auf, die durch Zugabe der „Puffersubstanz“ Bariumchlorid eliminiert wird. Die Calcium-Messung wird durch Natrium und Kalium beeinträchtigt. Während die Kalium-Blindwertstörung durch Zugabe von Kalium im Überschuß praktisch ausgeschaltet wird, müssen bei Verwendung unseres Gerätes die Calcium-Werte je nach dem Natrium-Gehalt der Proben nach der Parameter-Methode korrigiert werden.

The determination of sodium, potassium and calcium in urine with a filter flame photometer

A routine method is described for the measurement of urinary sodium, potassium and calcium. The optimal criteria for measurements with a filter flame photometer were determined and their reliability was tested. For the measurement of sodium, samples were diluted 1:400, for potassium 1:200 and for calcium 1:20. Ionisation interference was encountered in the measurement of sodium and this was eliminated by the addition of the "buffer substance" barium chloride. The measurement of calcium is impaired by sodium and potassium. While the interference by potassium in the blank values can be practically obviated by the addition of excess potassium salt, in the present apparatus the calcium values must be corrected according to the parameter method, depending on the sodium content of the samples.

Die Konzentration der Natrium-, Kalium- und Calcium-Ionen im Serum wird innerhalb enger Grenzen geregelt. Die Eichung der Geräte erfolgt mit wäßr. Lösungen, die diese Ionen in der mittleren Konzentration des Serums enthalten. Dadurch werden die wechselseitigen Störeinflüsse weitgehend kompensiert. Dagegen sind im Harn die Elektrolytkonzentrationen weitaus variabler, und auch ihr Verhältnis zueinander ist großen Schwankungen unterworfen. Bei 1800 Harnproben, die wir im Rahmen einer Studie über circadiane Rhythmen untersuchten, fanden wir folgende Konzentrationen:

Natrium	10 bis 330 mVal/l
Kalium	5 bis 200 mVal/l
Calcium unter der Nachweisgrenze bis	40 mVal/l

Ungeachtet der bei Serum und Harn unterschiedlichen Konzentrationen und Konzentrationsverhältnisse werden meist die für die Analyse von Serum vorgesehenen Eich- und Blindlösungen auch für die Analyse von Harn benutzt. Bei der Vorbereitung der oben genannten Untersuchungen war zu prüfen, ob dies zulässig ist. Die Angaben in der Literatur (1—7) über die Zuverlässigkeitskriterien der flammenphotometrischen Elektrolytbestimmung im Harn differieren erheblich. Das ist zum einen auf die unterschiedlichen Probeprobereitungen, zum anderen auf die Verschiedenheit der verwandten Flammenphotometer zurückzuführen. Wir ermittelten die optimalen Meßbedingungen für ein Filterflammenphotometer¹⁾.

Es wird eine Routinemethode für die Bestimmung von Natrium, Kalium und Calcium im Harn beschrieben. Die Prüfung dieser Methode einschließlich ihrer Zuverlässigkeitskriterien wird mitgeteilt.

¹⁾ Hersteller: Eppendorf Gerätebau Netheler & Hinz, Hamburg.

Methodik

Lösungen

Stammlösungen

1. 2N Natriumchlorid-Lösung.
 2. 1N Kaliumchlorid-Lösung.
 3. 0,2N Calciumchlorid-Lösung. Es werden 0,2 Val CaCO_3 eingewogen und mit der äquivalenten Menge HCl umgesetzt.
 4. 10proz. Bariumchlorid-Lösung.
- Die Lösungen 1. bis 3. werden aus bis zur Gewichtskonstanz getrockneten p. a. Substanzen der Firma Merck mit demineralisiertem Wasser hergestellt.

Eichlösung

Sie hat folgende Zusammensetzung:

Natrium	100 mVal/l
Kalium	100 mVal/l
Calcium	20 mVal/l

In einen 100 ml Meßkolben haben wir 5 ml Natrium-, 10 ml Kalium- und 10 ml Calcium-Stammlösung gegeben und bis zur Marke mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt.

Blindlösungen

Kalium: Sie enthält genau soviel Natrium und Calcium wie die Eichlösung, jedoch kein Kalium.
Calcium: Die Zusammensetzung entspricht der Eichlösung, jedoch wird das Calcium weggelassen.

Verdünnungslösung

0,1N Salzsäure.

Probeprobereitigung

Natrium-Messung: Mit Marburg-Pipetten¹⁾ werden 50 μ l Urin und 200 μ l der Bariumchlorid-Lösung in einen 20 ml Meßkolben pipettiert. Mit 0,1N HCl wird bis zur Marke aufgefüllt (Verdünnung 1:400).

Kalium-Messung: 50 μ l Urin werden in einen 10 ml Meßkolben gegeben, der mit 0,1N HCl bis zur Marke aufgefüllt wird (Verdünnung 1:200).

Calcium-Messung: 500 μ l Urin und 500 μ l der Kalium-Stammlösung werden mit Marburg-Pipetten in einen 10 ml Meßkolben

pipettiert. Mit 0,1N HCl wird bis zur Marke aufgefüllt (Verdünnung 1:20).

Gerät und Messung

Die Messungen werden mit dem Flammenphotometer Eppendorf¹⁾ vorgenommen. Als Brenngas dient für die Natrium- und Kalium-Messung Propan, für die Calcium-Messung Acetylen. Geräteeinstellung siehe Tabelle 1.

Tab. 1
Geräteeinstellung und Filter

	Filter (nm)	Preßluftdruck (kg/cm ²)	Brenngasdruck (mm H ₂ O)
Natrium	589	0,5	230
Kalium	770	0,5	230
Calcium	622	0,5	590

Unmittelbar vor Beginn der Messung werden die Eich- und Blindlösungen in gleicher Weise wie die Proben verdünnt und mit Zusätzen versehen.

Nach der Einbrennzeit von 15 Min. werden Nullpunkt und Eichpunkt unter Ansaugen der Blind- bzw. Eichlösung einreguliert. Eine Zwischeneichung wird nach jeder 2. bis 4. Messung vorgenommen.

Die bei der Calcium-Messung erhaltenen Werte werden je nach dem Natrium-Gehalt der Proben anhand von Abbildung 6 korrigiert. Übersteigt die Natrium-Konzentration den Wert von 250 mVal/l, so sollte die Messung bei stärkerer Verdünnung (1:1000) wiederholt werden.

Messung größerer Serien

Zur Messung einer großen Anzahl von Proben in kürzerer Zeit hat sich uns folgendes Verfahren bewährt: Die bei der Natrium- und Calcium-Messung erforderlichen Zusätze werden zur Verdünnungslösung hinzugegeben. Die Proben werden mit Marburg-Pipetten in Kunststoffbecher²⁾ pipettiert, die Verdünnungslösungen mit Zipetten³⁾ zugegeben.

Die Verdünnungslösungen werden wie folgt hergestellt: Natrium: 10 ml der Bariumchlorid-Stammlösung werden in einem 1 l Meßkolben mit 0,1N HCl aufgefüllt.

Kalium: Die Verdünnungslösung für Kalium ist 0,1N HCl.

Calcium: 50 ml der Kalium-Stammlösung werden in einen 1 l Meßkolben pipettiert und mit 0,1N HCl aufgefüllt.

Probenvorbereitung

Natrium: 50 µl Urin plus 20 ml der Verdünnungslösung für Natrium.

Kalium: 50 µl Urin plus 10 ml der Verdünnungslösung für Kalium.

Calcium: 0,5 ml Urin plus 10 ml Verdünnungslösung für Calcium.

Prüfung der Methode

Zur Prüfung der Methode wurden zunächst Eichkurven bei verschiedenen Verdünnungen aufgenommen. Dabei wurden wäßr. Lösungen der Elektrolyte benutzt, die aus den oben beschriebenen Stammlösungen hergestellt wurden, und die im folgenden als Modellurine bezeichnet werden.

An diesen Modellurinen wurde der wechselseitige Einfluß von Natrium, Kalium und Calcium untersucht, die wir im folgenden für jedes Element getrennt darstellen.

Natrium

Verdünnung und Störeinfluß durch Kalium

Für den Bereich von 0 bis 200 mVal/l Natrium wurde die Eichkurve ermittelt. Dazu wurden alle Modellurine mit 0,1N HCl 1:200 verdünnt. Der Nullpunkt wurde mit 0,1N HCl eingestellt. Die Eichlösung enthielt 100 mVal/l Natrium. Die Eichkurve ist gerade (Kurve a, Abb. 1).

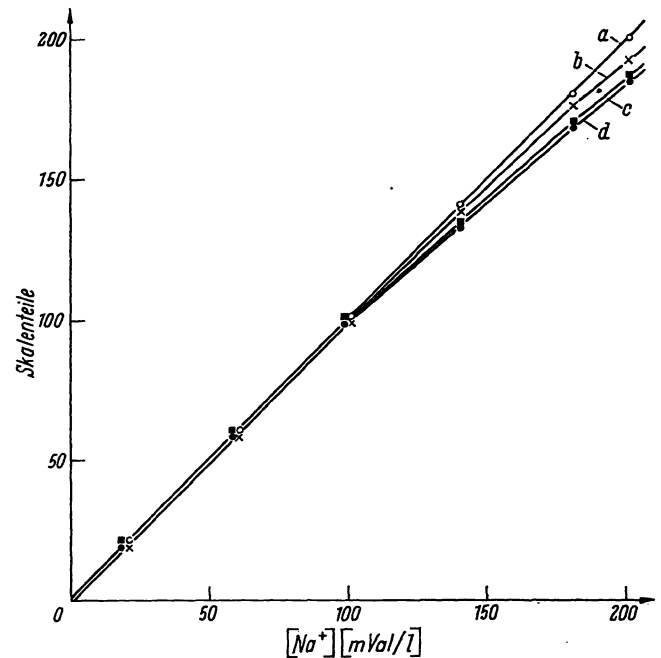


Abb. 1

Natrium-Eichkurven bei 1:200 Verdünnung. Die Modellurine haben folgenden Kalium-Gehalt: Kurve a kein Kalium, Kurve b: 10 mVal/l, Kurve c: 100 mVal/l und Kurve d: 200 mVal/l

Gibt man zu allen Modellurinen 20 mVal/l Calcium — das entspricht dem mittleren Calcium-Gehalt des Urins — so erhält man eine Eichkurve, die identisch ist mit der reinen Natriumchlorid-Lösungen. Gibt man jetzt zu den Modellurinen sowie zu Eich- und Blindlösung Kalium hinzu, so weisen die Eichkurven im höheren Konzentrationsbereich eine konvexe Krümmung auf. In Abbildung 1 sind drei solcher Kurven (b, c, d) aufgezeichnet. Die Modellurine sowie die Eich- und Blindlösungen enthielten jeweils 10 (b), 100 (c) und 200 (d) mVal/l Kalium. Die Krümmung nimmt mit zunehmendem Kalium-Gehalt zu. Da die Krümmung nur bei höheren Natrium-Konzentrationen in Erscheinung tritt, sind bei stärkerer Verdünnung gerade Eichkurven zu erwarten. Das zeigt Eichkurve b (Abb. 2). Die Verdünnung beträgt hier 1:400. Eichlösung und Modellurine enthielten neben Natrium 100 mVal/l Kalium und 20 mVal/l Calcium. Als Blindlösung diente 0,1N HCl. Bei einer Verdünnung der Modellurine von 1:400 variierten wir erneut den Kalium-Gehalt. Dabei wurde die gleiche Eichlösung benutzt, mit der die Kurve c (Abb. 1) aufgenommen wurde. Die Emission der Mo-

²⁾ Hersteller: Fa. Bellaplast, Wiesbaden.

³⁾ Hersteller: Quickfit Laborglas GmbH., Wiesbaden Schierstein.

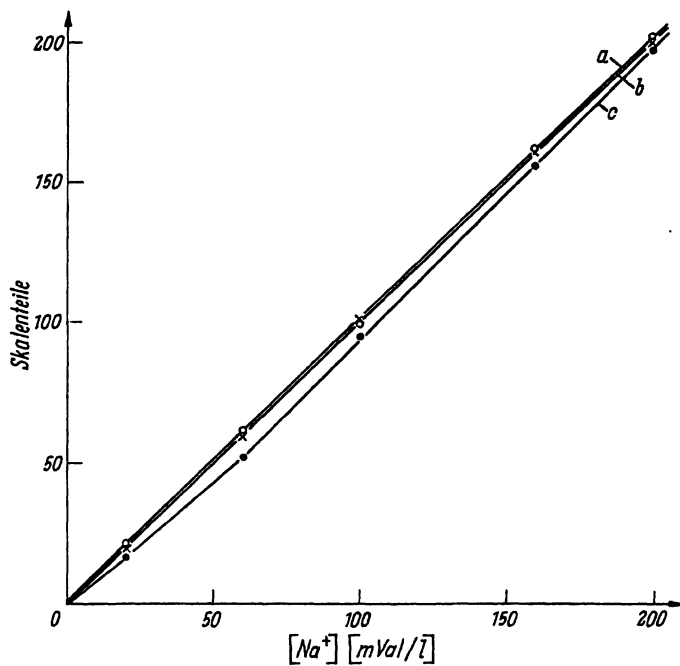


Abb. 2

Natrium-Eichkurven bei 1:400 Verdünnung. Der Kaliumgehalt der Modellurine beträgt bei Kurve a 200 mVal/l, bei Kurve b 100 mVal/l und bei Kurve c 10 mVal/l

dellurine mit 10 mVal/l Kalium (Kurve c Abb. 2) war geringer, als die der Lösungen, die 100 mVal/l Kalium (Kurve b) enthielten. Dagegen fand sich kein Unterschied zwischen den Modellurinen mit 100 und 200 mVal/l Kalium. Zur Klärung der Frage, ob das geschilderte Phänomen seine Ursache in einer durch Kalium bedingten Blindwertstörung hat, wählten wir folgenden Versuchsansatz: Wir stellten 4 Lösungen her, die 10, 50, 100 und 200 mVal/l Kalium enthielten. Diese Lösungen wurden mit 0,1N HCl 1:400 verdünnt. Der Nullpunkt wurde eingestellt mit 0,1N HCl, der Eichpunkt mit einer Lösung, die 100 mVal/l Natrium enthielt und entsprechend verdünnt wurde. Wir beobachteten bei keiner der 4 Lösungen einen Ausschlag am Meßgerät. Damit schied eine Blindwertstörung aus. Danach ist es auch überflüssig, bei einer Verdünnung von 1:400 der Blindlösung Kalium beizugeben.

Die konkave Krümmung der Eichkurve c (Abb. 2) läßt vermuten, daß hier eine Ionisationsstörung vorliegt (8). Das heißt, daß ein Teil der Natrium-Atome ionisiert vorliegt. Diese Ionen emittieren keine Strahlung mehr. Die Modellurine der Kurven a und b (Abb. 2) enthalten mehr Kalium. Damit gelangen mehr freie Elektronen in die Flamme. Die Ionisation des Natriums wird zurückgedrängt. Es ist seit langem bekannt, daß Ionisationsstörungen durch Zugabe von „Elektronendonatoren“ beseitigt werden können. Als solche haben sich Cäsium, Lithium, Barium und andere Substanzen bewährt (10, 11). Wir nahmen die Eichkurven mit 10 bzw. 200 mVal/l Kalium noch einmal auf, nachdem wir zu den 1:400 verdünnten Modellurinen, zu jeweils 20 ml Eich- und Blindlösung 0,2 ml einer 10proz. Cäsiumchlorid-Lösung gegeben hatten. Auch die Konzentrationsreihe von 20 bis 200 mVal/l Natrium, die nur 10 mVal/l Kalium enthielt, ergab jetzt eine gerade Eich-

kurve. Emissionsunterschiede zwischen den Proben mit hohem und niedrigem Kalium-Gehalt waren nicht mehr nachweisbar. Den gleichen Effekt konnten wir durch Zugabe von 0,2 ml einer 10proz. Bariumchlorid-Lösung in 20 ml Verdünnung erzielen. Diese Beobachtung bestätigt die Vermutung, daß die Krümmung der Eichkurve c (Abb. 2) auf eine Ionisationsstörung zurückzuführen ist.

Einfluß von Calcium

Wie bereits oben ausgeführt, stört Calcium die Natrium-Messung nicht. Zur statistischen Absicherung wählten wir folgenden Versuchsansatz:

Es wurden Modellurine, die 20, 100 und 200 mVal/l Natrium und je 2 mVal/l Calcium enthielten, angesetzt. In einem parallelen Ansatz wurden Modellurine gleichen Natrium-Gehaltes, aber mit 40 mVal/l Calcium hergestellt. Die Eichlösung enthielt 100 mVal/l Natrium und 20 mVal/l Calcium. Die Verdünnung betrug 1:400.

Tab. 2

Einfluß des Calciums auf die Natrium-Messung. An 5 verschiedenen Tagen wurden je 2 Messungen vorgenommen

Zusammensetzung des Modellurins mVal/l			Natrium \bar{x} (n = 10) mVal/l	Differenz der Mittelwerte in Prozent der Sollwerte $\Delta \bar{x} \%$	Paaranalyse t-Test t
Na	K	Ca			
20	100	2	21,85		
20	100	40	22,05	+1 %	1,660
100	100	2	99,20		
100	100	40	99,40	+0,2 %	0,004
200	100	2	198,10		
200	100	40	199,10	+0,5 %	1,770

Tabelle 2 gibt die Ergebnisse wieder. Wir wandten den t-Test für gepaarte Daten auf das Zahlenmaterial an. Zwischen den Proben mit hohem und niedrigem Calcium-Gehalt findet sich kein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$).

Kalium

Einfluß der Probenverdünnung

Wir stellten Eichkurven für den Konzentrationsbereich von 10 bis 200 mVal/l Kalium auf. Als Blindlösung diente 0,1N HCl, die zugleich als Verdünnungslösung benutzt wurde. Verdünnt man Eichlösung und Modellurine wie bei der Messung mit Serum 1:20, so erhält man eine konvex gebogene Eichkurve (Kurve c, Abb. 3). Auch bei der Verdünnung 1:100 ist die Eichkurve, wenn auch weniger ausgeprägt, konvex (Kurve b, Abb. 3). Als Ursache der Krümmung kommt am ehesten Selbstabsorption oder eine Transportstörung in Frage.

Tab. 3
Meßwerte der Kaliumeichkurve

Zusammensetzung der Modellurine mVal/l			Kalium \bar{x} (n = 10) mVal/l	Standardabweichung S	95proz. Vertrauensbereich von \bar{x}
Na	K	Ca			
100	10	20	9,6	0,39	0,28
100	50	20	50,0	1,15	0,82
100	100	20	100,5	2,03	1,45
100	150	20	151,4	2,07	1,48
100	200	20	201,3	2,10	1,50

Tab. 4
Einfluß von Natrium und Calcium auf die Kaliummessung

Zusammensetzung des Modellurins mVal/l			Kalium \bar{x} (n = 24) mVal/l	95proz. Vertrauensbereich für $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	Differenz der Mittelwerte in Prozent der Sollwerte $\Delta \bar{x} \%$	Paaranalyse t
Na	K	Ca				
20	10	20	9,35	0,14		
200	10	20	9,60	0,15	+2,50 %	3,97
20	200	20	201,42	0,87		
200	200	20	200,96	0,85	+0,23 %	1,17
100	10	2	9,56	0,15		
100	10	40	9,52	0,11	-0,40 %	0,31
100	200	2	201,91	0,84		
100	200	40	201,29	1,10	-0,31 %	1,47

Tab. 5
Einfluß von Natrium und Kalium auf die Calcium-Messung. An 5 Tagen wurden je 2 Messungen ausgeführt. Die Mittelwerte eines jedes Tages werden gepaart

Zusammensetzung des Modellurins mVal/l			Calcium \bar{x} (n = 10) mVal/l	Standardabweichung S	Differenz Meßwert—Sollwert in Prozent $\Delta \bar{x} \%$	Paaranalyse t
Na	K	Ca				
20	100	2	1,84	0,13	-8 %	
200	100	2	2,30	0,11	+15 %	17,14
20	100	10	9,76	0,26	-2,4 %	
200	100	10	10,28	0,46	+2,8 %	2,24
20	100	20	19,90	0,22	-0,5 %	
200	100	20	19,98	0,18	-0,1 %	1,17
20	100	40	39,92	0,42	-0,2 %	
200	100	40	39,84	0,39	-0,4 %	1,21
100	10	2	1,72	0,18	-14,0 %	
100	200	2	2,41	0,17	+20,5 %	4,52
100	10	20	20,07	0,26	+0,35 %	
100	200	20	20,23	0,27	+1,15 %	3,46
100	10	40	40,20	1,00	+0,50 %	
100	200	40	40,29	0,74	+0,73 %	0,32

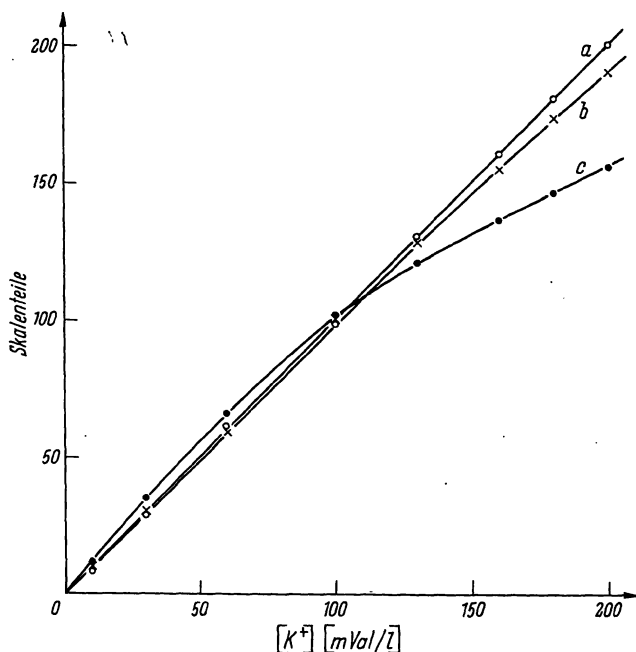


Abb. 3
Kalium Eichkurven bei verschiedenen Verdünnungen. Kurve a: 1:200, Kurve b: 1:100, Kurve c: 1:20

Dagegen erhält man bei weiterer Verdünnung auf 1:200 eine gerade Eichkurve (Kurve a, Abb. 3).

Störeinflüsse von Natrium und Calcium

Wir gaben zu allen Modellurinen, zu Eich- und Blindlösungen 100 mVal/l Natrium und 20 mVal/l Calcium. Das entspricht dem mittleren Natrium- bzw. Calcium-Gehalt des Urins. Es wurde wiederum 1:200 verdünnt. Die Eichkurve war auch jetzt gerade. Die zugehörigen Meßwerte sind in Tabelle 3 aufgeführt. Der Einfluß variabler Natrium- und Calcium-Gehalte wurde an

1:200 verdünnten Modellurinen geprüft. Dazu wurden Lösungen mit konstantem Kaliumgehalt hergestellt (10 bzw. 200 mVal/l). Der Natrium- bzw. Calciumzusatz wurde variiert. Die Tabelle 4 gibt in der linken Spalte die Zusammensetzung der unverdünnten Modellurine wieder. An acht aufeinanderfolgenden Tagen wurden je 3 Ansätze gemessen. Die Mittelwerte jeden Tag wurden gepaart. Der t-Test ergab keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen den Proben mit hohem und niedrigem Natrium- bzw. Calciumgehalt. Die Kaliummessung wurde also nicht durch variable Natrium- und Calciumkonzentrationen der Proben beeinflusst. Eine Ausnahme fand sich nur bei den Proben, die 10 mVal/l Kalium und variable Mengen Natrium enthielten. Hier war der t-Test signifikant ($p < 0,01$). Die Differenz der Mittelwerte ist mit 0,25 mVal/l allerdings sehr gering und kann praktisch vernachlässigt werden.

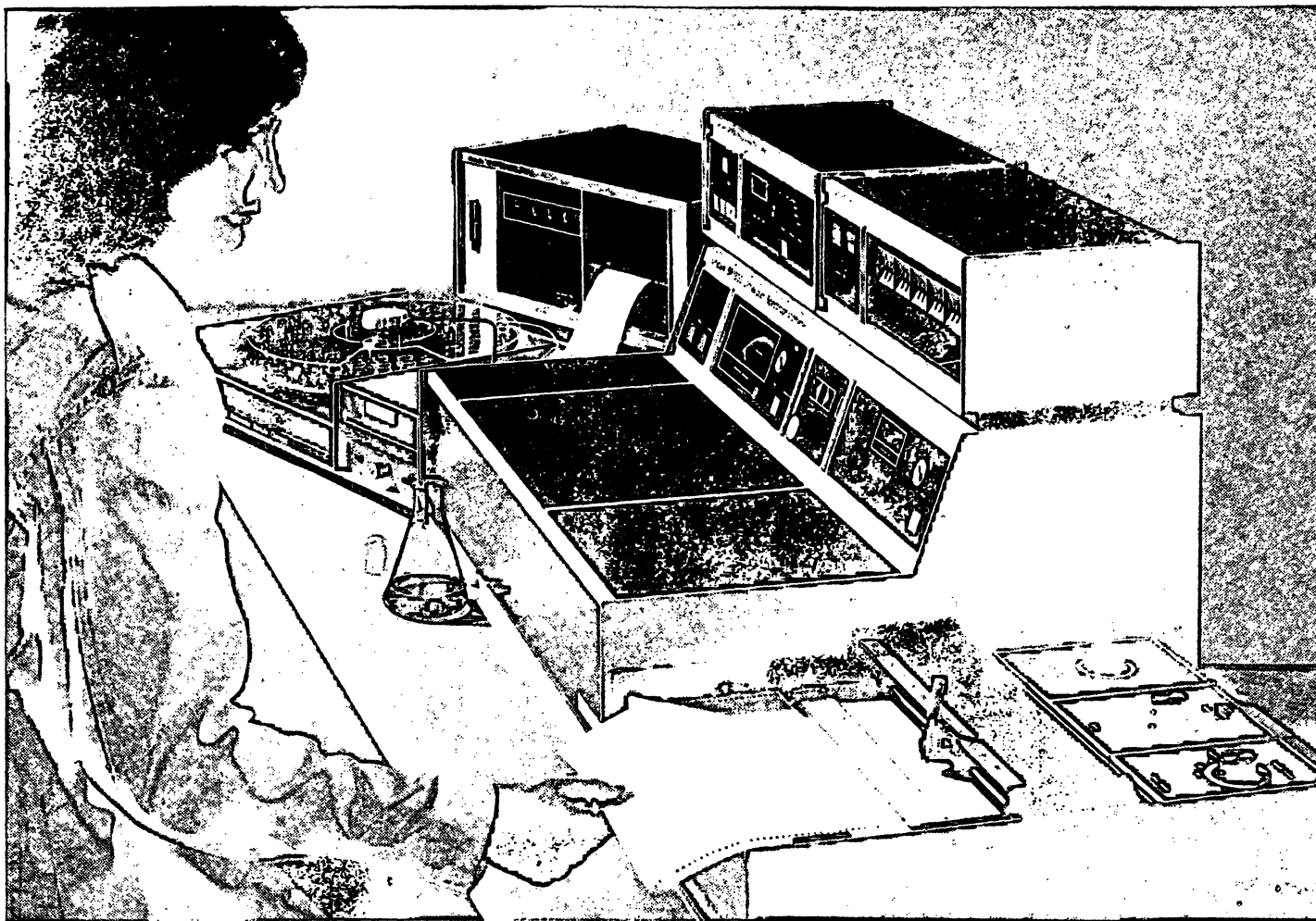
Calcium

Eichkurven

Wir untersuchten zunächst, ob die Calcium-Eichkurve zwischen 0 und 40 mVal/l gerade ist. Dabei wurden Eichlösungen und Modellurine 1:20 verdünnt. Als Blindlösung und als Verdünnungslösung diente wiederum 0,1N HCl. Die Eichlösung enthielt 20 mVal/l Calcium. Die Eichkurve war gerade. Bei stärkerer Verdünnung (1:50, 1:100), wie sie in Hinblick auf die unten beschriebenen Störeinflüsse wünschenswert gewesen wäre, waren die Messungen schlecht reproduzierbar.

Störeinflüsse von Natrium und Kalium

Wir prüften den Einfluß des Natriums auf die Calcium-Messung mit folgendem Versuchsansatz: Der Calcium-



Sie analysieren vielseitiger, schneller, bequemer und erzielen genauere Ergebnisse mit dem UV-Spektralphotometer SP 1800 — eine Neuentwicklung aus dem Programm **PYE UNICAM**

damit ist Ihr Analysenproblem gelöst

Das Doppelstrahl-Spektralphotometer für den ultravioletten und sichtbaren Bereich hat die hohe photometrische Genauigkeit von $\pm 0,002$ E. Es wird als Grundgerät eingesetzt mit direkter Extinktionsanzeige auf eingebautem Zeigerinstrument mit 4 Extinktionsskalen (0–0,2 E; 0–0,5 E; 0–1,0 E und 0–2,0 E); umschaltbar für Konzentrationsanzeige; hochauflösendem Gitter-Monochromator; großem Probenraum und zweiter Probenstelle; automatischem Lampenwechsel.

Als vollautomatisches Spektralphoto-

meter-System bietet es Ihnen durch mehrere Zusatz-Einheiten weitere Vorteile:

Spektrendarstellung — komprimierte und gedehnte Spektren — durch synchronisierte Registrierung auf dem Schreiber AR 25; digitale Datenausgabe; wiederholte Registrierung eines Wellenlängenbereiches sowie bei mehreren automatisch vorwählbaren Wellenlängen; Mehrkanalbetrieb für kinetische Untersuchungen; automatischer Probenwechsler; besondere Schaltungen erlauben das Programmieren von wiederholten, ver-

zögerten oder ferngesteuerten Messungen mehrerer Proben.

Ausführliches Informationsmaterial liegt für Sie bereit. Bitte fordern Sie es an.

Philips Elektronik Industrie GmbH
2000 Hamburg 63 · Röntgenstraße 22
Telefon (0411) 50 10 31

Büros in: Berlin Tel. (0311) 24 59 08, Düsseldorf Tel. (0211) 34 60 51, Dortmund Tel. (0231) 4 19 61, Frankfurt Tel. (0511) 7 81 31, Hannover Tel. (0511) 1 66 01, München Tel. (0811) 7 67 91, Stuttgart-Fellbach Tel. (0711) 58 90 81, Bielefeld Tel. (0521) 230 81, Bremen Tel. (0421) 31 00 41, Nürnberg Tel. (0911) 46 47 63.



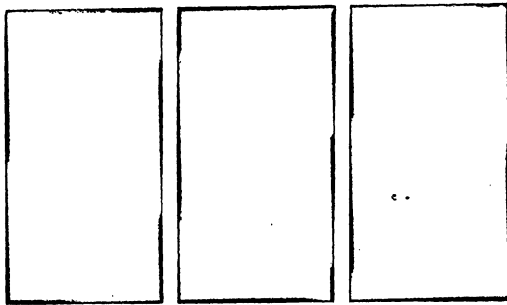
Analysengeräte

Wir interessieren uns für das beschriebene UV-Spektralphotometer SP 1800 und bitten um

- ☐ Zusendung ausführlicher Unterlagen
- ☐ ein Angebot
- ☐ eine unverbindliche Vorführung

Gewünschtes bitte ankreuzen oder ergänzen

PHILIPS



MILLIPORE

Pellicon®-Ultrafiltrations-Systeme mit Pellicon®-UF-Membranen zur

- Trennung gelöster Substanzen nach dem Molekulargewicht
- Entsalzung wäßriger Lösungen
- Eiweißkonzentration in Liquor und Urin für die Elektrophorese (Auswertungen mit dem Millipore Phoroscope®-Auswertegerät)

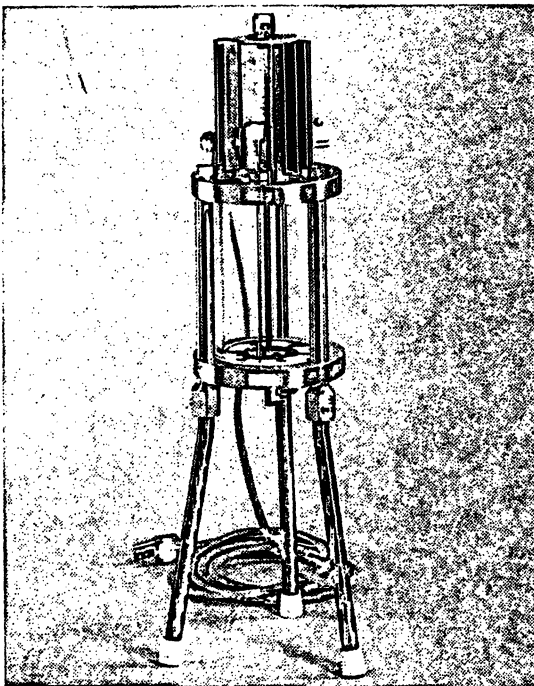


Abb.: Millipore Ultrafiltrationszelle mit Vibrator für hohe Leistungen

Millipore Arbeitsbereiche, z. B.

- Zytologische Untersuchungsverfahren
- Mikrobiologische Analysen von Körperflüssigkeiten

Besuchen Sie uns auf der ANALYTICA 70 am Stand 2308 in Halle 2 oder schreiben Sie uns einfach:

MILLIPORE FILTER GMBH

6078 Neu-Isenburg, Siemensstraße 20, Tel.: 06102-6066

Schneeweiß

Allgemeine Mikrobiologie

Leitsätze für Studierende und Ärzte

von Prof. Dr. med. ULRICH SCHNEEWEISS
unter Mitarbeit von EVA-MARIA FABRICIUS

Groß-Oktav. XII, 343 Seiten. Mit 111 Abbildungen
und 46 Tabellen. 1968. Plastik flexibel DM 20,—

Der Band gibt eine Übersicht über allgemeinbiologische Gesetze der Epidemiologie (Seuchenkunde, Entkeimungslehre, Chemotherapie), Immunologie (Infektionslehre, Resistenz, Allergie, Immunität, Antigen-Antikörper, experimentelle Tumorummunologie, allgemeine Impflehre), Bakteriologie (Morphe, Wachstum, Genetik, Stoffwechsel, Kultur, Ökologie, Systematik, allgemeine Diagnostik) und der Virologie (Morphe, Züchtung, Virus-Wirtsbezeichnungen, Einteilung der Viren, allgemeine Diagnostik).

Schneeweiß

Spezielle Mikrobiologie

Leitsätze für Studierende und Ärzte

von Prof. Dr. med. ULRICH SCHNEEWEISS
unter Mitarbeit von EVA-MARIA FABRICIUS

Groß-Oktav. XII, 477 Seiten. Mit 158 Abbildungen
und 39 Tabellen. 1968. Plastik flexibel DM 30,—

Im zweiten Band werden die Erreger der beim Menschen vorkommenden Infektionen einschließlich der zu ihrem Nachweis zur Verfügung stehenden kulturellen, serologischen und immunologischen Methoden, deren Ergebnisse und Deutungen eingehend beschrieben. Die straffe Gliederung der einzelnen Kapitel wurde sorgfältig vorgenommen. Es gelang dadurch, das Wesentliche herauszustellen. Die Leitsätze in Fettdruck sind besonders einprägsam abgefaßt und lockern den Text angenehm auf.

Walter de Gruyter & Co · Berlin

Gehalt der Modellurine wurde jeweils bei 2, 10, 20 und 40 mVal/l konstant gehalten. Natrium wurde einmal in hoher (200 mVal/l), einmal in niedriger (20 mVal/l) Konzentration zugegeben. Eich- und Blindlösung enthielten Natrium in mittlerer Konzentration (100 mVal/l). Die Verdünnung betrug 1 : 20. Die Tabelle 5 gibt diese Untersuchungen wieder. Es wurde der t-Test für gepaarte Daten auf das Zahlenmaterial angewandt. Bei 2 mVal/l Calcium gaben die Proben mit hohem Natrium-Gehalt signifikant ($p < 0,01$) höhere Werte als die mit niedrigem Natrium-Gehalt. Die Differenz der Mittelwerte betrug 23% des Sollwertes (2 mVal/l). Bei höheren Calcium-Konzentrationen ließen sich keine signifikanten Differenzen nachweisen, was auf die mit höheren Werten zunehmende Streuung zurückzuführen sein kann. In einem analogen Versuchsansatz wurde der Kalium-Einfluß auf die Calcium-Messung untersucht. Die Zusammensetzung der Modellurine sowie der Ergebnisse sind im unteren Teil der Tabelle 5 aufgeführt. Auch hier findet sich bei 2 mVal/l Calcium ein signifikanter Unterschied zwischen den Proben mit hohem und niedrigem Kalium-Gehalt ($p < 0,01$). Die Differenz der Mittelwerte beträgt 34,5%. Auch bei 20 mVal/l Calcium fand sich ein signifikanter Unterschied, dem jedoch keine praktische Bedeutung zukommt, da die Mittelwerte nur um 0,8% differieren.

Diese beschriebene Einwirkung von Natrium und Kalium auf die Calcium-Messung ist als Blindwertstörung aufzufassen, wie wir im folgenden Versuch zeigen konnten: Es wurde eine Natrium- und eine Kalium-Konzentrationsreihe von jeweils 0,1 bis 2 Val/l angesetzt. Die Eichlösung enthielt 4 mVal/l Calcium. Natrium- und Kalium-Lösungen sowie die Eichlösung wurden 1 : 20 verdünnt. Der Nullpunkt wurde mit 0,1N HCl eingestellt. Die Meßergebnisse sind in Abbildung 4 aufgezeichnet. Man sieht, daß z. B. 200 mVal/l Kalium einen Calcium-Gehalt von 1 mVal/l vortäuschen können. Während nun die Meßwerte für Natrium proportional mit Natrium-Gehalt zunehmen, wird die Steigung der Kalium-Kurve bei höheren Konzentrationen flacher.

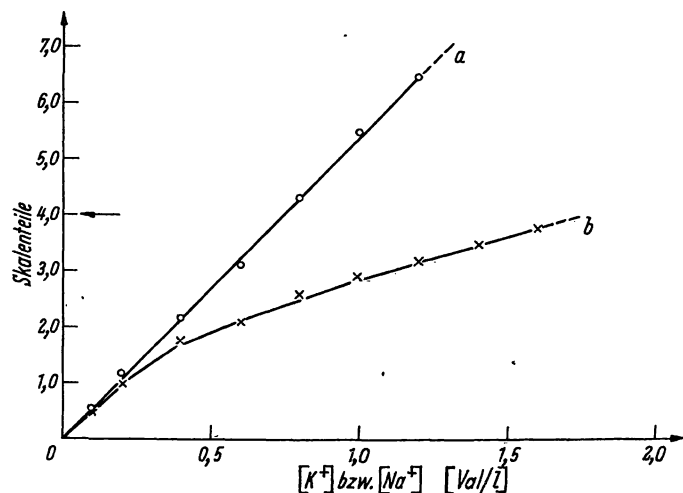


Abb. 4

Blindwertstörung bei der Calciummessung. Kurve a: Natriumkonzentrationsreihe, Kurve b: Kaliumkonzentrationsreihe. Die Eichlösung enthielt 4 mVal/l Calcium. Im gestrichelten Bereich der Kurven war die Anzeige am Gerät schwankend

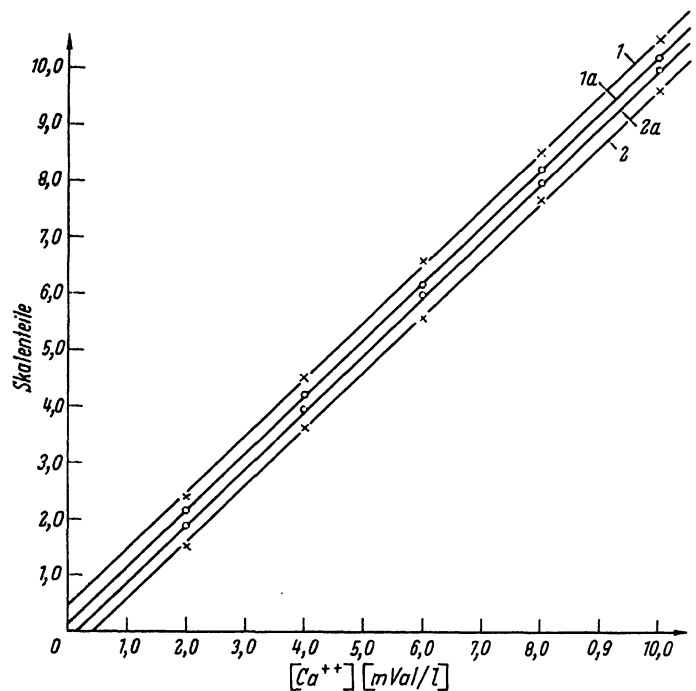


Abb. 5

Calciumeichkurven bei unterschiedlichem Kaliumgehalt der Modellurine. Kurve 1: 200 mVal/l, Kurve 2: 10 mVal/l. Kurve 1a und 2a wurden nach Zugabe von Kalium im Überschuss aufgenommen

Aus der Form der Kalium-Kurve ergibt sich, daß durch Zugabe von Kalium im Überschuss zu Modellurinen, Eich- und Blindlösung der Störeinfluß variabler Kalium-Mengen vermindert werden kann. Das zeigen die Meßergebnisse der Abbildung 5, mit Eichkurven zwischen 2 und 10 mVal/l Calcium. Die den Meßwerten der Kurve 1 entsprechenden Proben enthielten 200 mVal/l Kalium. Bei der Kurve 2 betrug die Kalium-Beimengung 10 mVal/l. Die gleichen Eichkurven wurden noch einmal nach Zugabe eines Kalium-Überschusses von 1 Val/l Modellurin aufgenommen. Die so erhaltenen Eichkurven sind näher aneinandergerückt (Kurve 1a und 2a). Die Differenz zwischen den Proben mit hohem und niedrigem Kalium-Gehalt wird kleiner als 0,2 mVal/l. Bei Verwendung der beschriebenen Eich- und Blindlösungen, die natürlich gleichfalls einen Kalium-Überschuß enthalten müssen, wird der auf extremen Kalium-Gehalt der Proben zurückgehende Fehler kleiner als 0,1 mVal/l.

Die Natrium-bedingte Blindwertstörung ist nicht durch Zugabe von Natrium im Überschuss auszugleichen, wie aus dem Verlauf der Natrium-Kurve in Abbildung 4 hervorgeht. Zum Ausgleich dieser Störung benutzten wir die Parametermethode (9). Wir beschränkten uns auf den Konzentrationsbereich bis 10 mVal/l, da die Blindwertstörung bei höheren Calcium-Konzentrationen — wie oben gezeigt — vernachlässigt werden kann. Wir nahmen eine Eichkurvenschar auf (Abb. 6). Dabei wurden folgende Natrium-Konzentrationen berücksichtigt: 20, 40, 100, 140 und 200 mVal/l. Alle hier gemessenen Modellurine enthielten Kalium im Überschuss (1 Val/l). Anhand dieser Abbildung können die gemessenen Calcium-Werte je nach Natrium-Gehalt des Urins korrigiert werden.

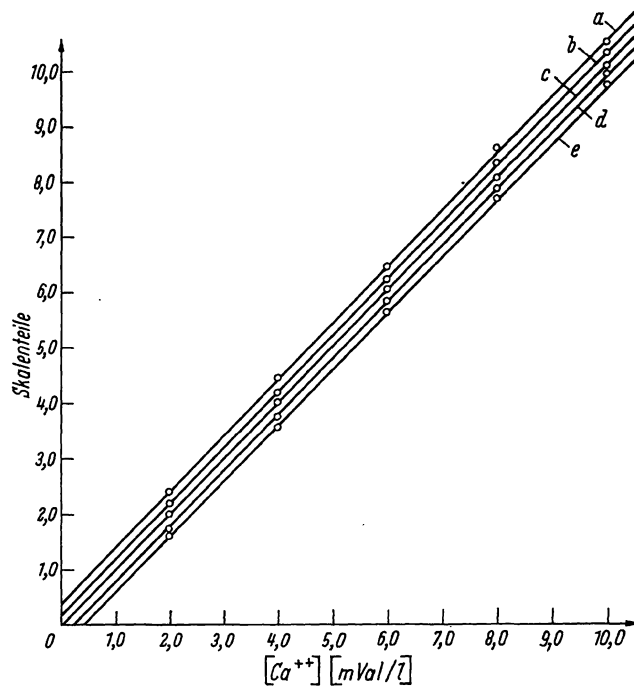


Abb. 6

Calciemeichkurven bei unterschiedlichem Natriumgehalt der Modellurine. a: 200, b: 140, c: 100, d: 40 und e: 20 mVal/l

Bei höheren Salzkonzentrationen ist u. U. mit einer „Transportstörung“ (8) zu rechnen, und damit mit einer Krümmung der Eichkurve. Zur Kontrolle stellten wir eine Eichkurve für den gesamten Konzentrationsbereich von 2 bis 40 mVal/l auf, wobei alle Proben, Eich- und Blindlösungen den beschriebenen Kaliumüberschuß enthielten. Die Eichkurve war gerade. Demnach liegt eine Transportstörung nicht vor.

Zuverlässigkeitsprüfung

Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit der Bestimmungen (reliability) wurden zunächst die Störeinflüsse von Anionen und organischen Verbindungen geprüft, weiterhin wurden Aufstockungs- und Veraschungsversuche gemacht, Präzision und Nachweisgrenze wurden bestimmt. Die Untersuchungen werden jeweils für Natrium, Kalium und Calcium gemeinsam dargestellt.

Einflüsse von Anionen und organischen Verbindungen

Bei der Prüfung der Anionen beschränkten wir uns auf die wichtigsten im Urin vorkommenden, nämlich Sulfat

und Phosphat. Auf eine Prüfung des Chlorideinflusses wurde verzichtet, weil der Harn mit 0,1N HCl verdünnt wurde. Weiterhin untersuchten wir den Einfluß von Harnstoff, dem bedeutendsten organischen Urinbestandteil. Als wichtiger pathologischer Harnbestandteil wurde Glucose berücksichtigt. Wir wählten folgende Versuchsanordnung: In einem parallelen Ansatz wurde neben einem Modellurin ohne die zu prüfenden anionischen und organischen Stoffe ein Modellurin, der 1proz. an $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, ein zweiter, der 1proz. an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und ein dritter, der 5proz. an Harnstoff war, gemessen. Die genannten Konzentrationen sind etwa 1,5mal so hoch wie die in der Literatur angegebenen oberen Grenzen des Normalbereiches für den 24-Stdn.-Urin (12). Bei allen drei Elektrolyten wurde jeweils eine hohe, eine niedrige und eine mittlere Konzentration berücksichtigt. Allen in der Tabelle 6 angeführten Werten liegen jeweils 5 Ansätze mit je 2 Messungen zugrunde. Zur Prüfung auf signifikante Differenzen wurde der t-Test für gepaarte Daten angewandt. Keiner der untersuchten Stoffe bewirkte eine signifikante Erhöhung oder Erniedrigung der Meßwerte ($p < 0,01$). Der Einfluß des Phosphates auf das Calcium konnte in diesem Ansatz nicht mitgeprüft werden, da sich wegen der geringen Löslichkeit des Calciumhydrogenphosphates von 5 $\mu\text{Mol/l}$ ein Niederschlag bildet. Da nach übereinstimmenden Angaben in der Literatur (Zusammenfassung 13) die Phosphateinwirkung auf das Calcium nicht von der Calcium-Konzentration, sondern nur von dem Calcium-Phosphor-Verhältnis abhängt, gingen wir folgendermaßen vor: Zu einer Lösung von 2 mVal/l Calcium setzten wir steigende Mengen Diammoniumhydrogenphosphat $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ zu. Die Blindlösungen

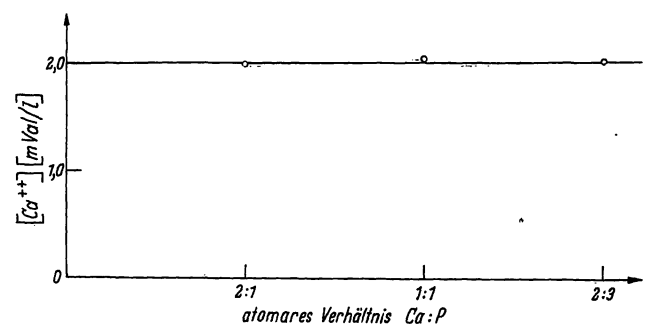


Abb. 7

Einfluß von Ammoniumhydrogenphosphat auf die Calciummessung. Alle Modellurine enthielten 2 mVal/l Calcium

Tab. 6

Einfluß von Phosphat, Sulfat und Harnstoff auf die Natrium-, Kalium und Calciummessung. Den Mittelwerten liegen je 5 Ansätze an 5 Tagen mit je 2 Messungen zugrunde

Elektrolytkonzentration (mVal/l) Harn ohne Beimengungen		1proz. an $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$		Elektrolytkonzentration (mVal/l), Modellurine		5proz. an Harnstoff	
vorgegeben	gefunden \bar{x}	gefunden \bar{x}	Paar-analyse t	1proz. an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefunden \bar{x}	Paar-analyse t	gefunden \bar{x}	Paar-analyse t
20 Na	20,55	21,60	0,98	21,10	1,20	20,65	1,00
100 Na	101,10	100,80	0,91	100,60	1,35	100,40	1,61
200 Na	198,30	198,10	1,09	197,50	0,78	197,40	0,11
10 K	9,5	9,57	0,62	9,60	0,79	9,47	0,34
100 K	99,79	99,70	0,48	99,83	0,34	99,13	1,59
200 K	199,07	198,90	0,33	200,37	1,14	198,33	0,79
2 Ca	2,09			2,12	0,85	2,07	1,24
20 Ca	20,07			20,39	0,13	19,89	2,56
40 Ca	39,98			40,45	3,06	39,69	2,08

Tab. 7

Einfluß von Glucose auf die Messung von Natrium, Kalium und Calcium. Die Modellurine enthielten 2,5% Glucose. An 5 Tagen wurden 5 Ansätze mit je 2 Messungen gemacht. Die Mittelwerte jedes Tages wurden gepaart

Elektrolyt	Konzentration vorgegeben	(mVal/l) gefunden \bar{x} (n = 10)	Differenz der Mittelwerte \bar{x}	Paaranalyse t
Natrium	20 ohne Glucose	20,85	+ 0,35	1,26
	20 mit Glucose	21,20		
	200 ohne Glucose	198,40	+ 0,30	0,61
	200 mit Glucose	198,70		
Kalium	10 ohne Glucose	9,45	- 0,05	0,38
	10 mit Glucose	9,40		
	200 ohne Glucose	201,10	- 0,85	1,74
	200 mit Glucose	200,25		
Calcium	2 ohne Glucose	1,99	+ 0,01	2,24
	2 mit Glucose	2,00		
	40 ohne Glucose	39,94	- 0,16	2,86
	40 mit Glucose	39,78		

enthielten jeweils Diammoniumhydrogenphosphat in gleicher Menge. Das Ergebnis dieses Versuches zeigt Abbildung 7. Auf der Abzisse sind die atomaren Calcium-Phosphor-Verhältnisse aufgetragen, auf der Ordinate die gemessenen Konzentrationen des Calciums. Das Phosphat beeinträchtigt die Calcium-Emission nicht.

In einem weiteren Ansatz wurde der Glucoseeinfluß untersucht. Hier wurden Modellurine, die 2,5% Glucose enthielten, mit solchen ohne Glucose verglichen. Einzelheiten des Ansatzes sowie die Ergebnisse sind der Tabelle 7 zu entnehmen. Für keiner der geprüften Kationen konnte eine Emissionsbeeinflussung gefunden werden.

Veraschungs- und Aufstockungsversuche

An den Modellurinen wurden nur die Einflüsse der quantitativ bedeutendsten Harnbestandteile untersucht. Es ist aber durchaus denkbar, daß auch andere Bestandteile die Bestimmung von Natrium, Kalium und Calcium beeinflussen. Weiterhin ist es möglich, daß unterschiedliche physikalische Eigenschaften (Viskosität, Oberflächenspannung usw.), von Urin und wäßr. Eich- und Blindlösungen die Messung beeinträchtigen. Zur Klä-

rung dieser Fragen wurden Veraschungsversuche und Aufstockungsversuche durchgeführt.

Veraschungsversuche

Je 1 ml eines frischen Morgenurins wurden in einen Platintiegel und in einen 20 ml Meßkolben gegeben. Der Urin im Tiegel wurde im Wärmeschrank bei 90° getrocknet und anschließend drei Stunden lang im Muffelofen bei 550° verascht. Der Rückstand wird in 0,1N HCl aufgenommen und ebenso wie der nicht veraschte Urin weiterverdünnt. Die Verdünnungen waren für Calcium 1 : 20, Kalium 1 : 200 und Natrium 1 : 400. Dabei wurde für die Calcium-Messung der Kalium-Überschuß, für die Natrium-Messung der Bariumchlorid-Zusatz in der oben beschriebenen Menge benutzt. Veraschte und native Proben wurden jeweils in einer Serie gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 aufgeführt. Danach lagen die Natrium-Werte bei den veraschten Proben im Mittel um 0,3% höher als bei den nicht veraschten. Die Paaranalyse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen veraschten und nicht veraschten Proben ($p < 0,01$). Die Kalium-Werte waren nach Veraschung im Mittel um 0,65% höher. Auch hier fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen veraschten und nicht veraschten Proben ($p < 0,01$). Bei Calcium dagegen bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$). Da die Werte nach der Veraschung im Mittel nur um 2,05% höher waren, halten wir eine entsprechende Korrektur der Meßwerte nicht für sinnvoll.

Aufstockungsversuche

FrISCHE Morgenurine wurden mit folgenden Mengen aufgestockt: Natrium: 40 mVal/l, Kalium: 50 mVal/l und Calcium: 10 mVal/l. Beim Natrium wurden zwischen 97,5 und 103,1% der zugegebenen Menge wiedergefunden. Die mittlere Wiederauffindungsrate betrug 100,07%. Beim Kalium wurden zwischen 98 und 102, im Mittel 99,67% wiedergefunden. Beim Calcium betrug die Wiederauffindungsrate im Mittel 100,97%. Die Werte schwankten zwischen 96,5 und 103,1%.

Tab. 8
Veraschungsversuche

native Probe	Natrium veraschte Probe	Differenz in %	native Probe	Kalium veraschte Probe	Differenz in %	native Probe	Calcium veraschte Probe	Differenz in %
103,75	104,00	+ 0,24	70,25	70,00	- 0,36	10,24	10,37	+ 1,27
154,75	155,75	+ 0,65	67,75	68,00	+ 0,37	3,61	3,75	+ 3,88
140,75	140,50	- 0,18	61,00	61,50	+ 0,82	13,41	13,97	+ 4,18
142,00	143,50	+ 1,06	65,50	66,75	+ 1,91	9,68	9,84	+ 1,65
164,50	165,50	+ 0,61	57,50	59,00	+ 2,61	14,78	15,03	+ 1,69
161,50	161,75	+ 0,15	14,00	13,75	- 1,79	3,45	3,50	+ 1,45
84,50	84,50	± 0,00	36,75	37,00	+ 0,68	5,82	5,98	+ 2,74
125,50	125,00	- 0,40	35,50	35,50	± 0,00	5,60	5,70	+ 1,79
171,00	172,00	+ 0,58	47,75	48,50	+ 1,57	22,14	22,36	+ 0,99
						10,89	10,98	+ 0,83

Tab. 9
Präzision der Natrium-, Kalium- und Calcium-Messung

Element	Mittelwert \bar{x}	Streuung von Tag zu Tag (n = 13) Standardabweichung S	Variationskoeffizient VK	Streuung in der Serie (n = 13) Standardabweichung S	Variationskoeffizient VK
Natrium	76,23	1,36	1,78%	1,30	1,70%
Kalium	30,08	0,86	2,87%	0,68	2,26%
Calcium	5,54	0,10	2,18%	0,08	1,67%

Präzision und Nachweisgrenze

An einem bei -20° eingefrorenen Poolurin wurden täglich Doppelbestimmungen vorgenommen. Es wurde die Streuung von Tag zu Tag sowie die Streuung in der Serie aus Doppelbestimmungen (14) errechnet. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 9. Für Calcium, das von den drei untersuchten Elektrolyten in geringster Menge ausgeschieden wird, ermittelten wir die Nachweisgrenzen nach KAISER und SPECKER (15). Sie betrug 0,04 mVal/l.

Diskussion

Zunächst soll zu der eingangs aufgeworfenen Frage, ob die Serumeich- und Blindlösungen für die Bestimmung von Natrium, Kalium und Calcium im Harn geeignet sind, Stellung genommen werden.

Natrium

Mißt man Natrium wie im Serum bei einer Verdünnung von 1 : 200, so können, bedingt durch den unterschiedlichen Kaliumgehalt des Urins, erhebliche systematische Fehler auftreten, die durch die Krümmung der Eichkurve bedingt sind. Die Depression der Natrium-Emission durch Kalium ist bereits früher (16) beschrieben worden. Die Störung ließ sich durch stärkere Verdünnung der Proben eliminieren. Die dabei neu auftretende Ionisationsstörung konnten wir durch Zugabe der „Puffersubstanzen“ Bariumchlorid und Caesiumchlorid ausgleichen. Wir benutzten Bariumchlorid, da es wesentlich billiger ist.

Kalium

Die Kalium-Messung wird — im Gegensatz zur Natrium- und Calcium-Messung — nicht durch die anderen im Urin vorhandenen Kationen beeinträchtigt. Voraussetzung für eine gerade Eichkurve ist allerdings eine ausreichende Verdünnung (1 : 200) der Proben. Die Verwendung der Serumeichlösung ist nicht empfehlenswert, weil sie nur 3,84 mVal/l Kalium enthält. Der Eichpunkt läge mithin an der unteren Grenze des im Urin gefundenen Konzentrationsbereiches von 0 bis 200 mVal/l.

Calcium

Eine zuverlässige Calcium-Messung im Urin ist ohne Berücksichtigung des Natrium- und Kalium-Gehaltes der Proben nicht möglich. Infolgedessen ist die Serumeich- und Blindlösung für die Urinmessung praktisch

ungeeignet. Als Ursache der Blindwertstörung müssen zwei Faktoren diskutiert werden:

1. die mangelnde Selektivität des Filters; das ist besonders für die Störung durch Natrium sehr wahrscheinlich, da die Natrium-Linie der Calcium-Bande unmittelbar benachbart ist.

2. Die Anhebung des Flammenuntergrundes durch die Störelemente; diese Annahme dürfte für die Kalium-Störung zutreffen. Die Kalium-Linie liegt so weit von der Calciumoxyd-Bande entfernt, daß mangelnde Filterselektivität als Störursache nicht wahrscheinlich ist. Die von BOLD (5) vorgeschlagene Zugabe von Kalium im Überschuß hat sich auch bei uns bewährt. Dagegen können wir die Beobachtung von FAWCETT und WYNN (4) nicht bestätigen, wonach sich durch Zugabe großer Natrium-Mengen zu den Proben sowohl die Kalium- als auch die Natrium-Störung ausschalten lassen. Die Autoren benutzen allerdings ein anderes Meßgerät⁴⁾.

Die Ergebnisse bei der Untersuchung der Calcium-Meßbedingungen sind nicht ohne Vorbehalte auf Meßgeräte des gleichen Typs übertragbar. Das hat seinen Grund darin, daß kein Calcium-Filter dem anderen exakt gleicht. Damit kann auch die Durchlässigkeit für die Natrium- und Kalium-Emission von Fall zu Fall verschieden sein. Die von uns gemachten Vorschläge können daher nur als Richtlinien zur Prüfung der Meßbedingungen angesehen werden, die überprüft werden müssen.

Wir fanden keine Beeinflussung der geprüften Kationen durch Sulfat und Phosphat. Insbesondere wurde die Calcium-Emission nicht durch Phosphat gemindert. Nach ALKEMADE (17) ist der Phosphateinfluß um so geringer, je kleiner die in die Flamme gelangenden Tröpfchen sind. Der Effekt wird um so kleiner, je größer die Höhe über dem zentralen Verbrennungskegel ist, in der gemessen wird. Wie FILCEK 1958 (13) zeigen konnte, sind diese Größen beim Eppendorfgerät so gewählt, daß der Phosphateinfluß vernachlässigbar klein ist.

Nach den hier mitgeteilten Untersuchungen ist es also möglich, Natrium, Kalium und Calcium im Harn bei entsprechender Probearbeitung und Eichung zuverlässig zu bestimmen.

Wir danken Herrn Prof. Dr. R. HERRMANN, Gießen, für die anregenden Diskussionen und wertvollen Hinweise sowie für die Durchsicht des Manuskriptes.

⁴⁾ SP 900, Unicam, Cambridge.

Literatur

1. RIETHMÜLLER, H. U. und A. BRETSCHNEIDER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 293, 49 (1953). — 2. DULCE, H. J., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 302, 103 (1955). — 3. KAPISCHKE, F. und H. BERNING, Ärztl. Wschr. 15, 66 (1960). — 4. FAWCETT, J. K. und V. WYNN, J. Clin. Path., London 14, 463 (1961). — 5. BOLD, A. M., J. Clin. Path., London 19, 625 (1966). — 6. ISAKSSON, B., J. med. Lab. Technol. 25, 119 (1968). — 7. PETER, G., Ärztl. Lab. 15, 149 (1969). — 8. HERRMANN, R. und C. TH. ALKEMADE, Flammenphotometrie, 2. Aufl. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1960). — 9. Ebenda S. 211. — 10. HEGEMANN, F., H. KOSTYRA und

B. PFAB, Glastechn. Ber. 30, 14 (1956). — 11. FISCHER, J. und A. DOWA, Coll. Spectr. Intern., Pergamon Press Ltd. London, (1956). — 12. GEIGY, J. R., Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen 6. Aufl. (1960). — 13. FILCEK, M., Z. Pflanzenernähr. Düng., Bodenkunde, 85, 112 (1958). — 14. YODEN, W. J., Statistical techniques for Collaborative Tests, The Association of Official Analytical Chemists, Washington (1967). — 15. KAISER, H., Z. analyt. Chem. 209, 1 (1965). — 16. KNAUFF, R. E., Clin. chim. Acta (Amsterdam) 20, 135 (1968). — 17. ALKEMADE, C. T. J. und M. H. VOORHUIS, Z. analyt. Chem. 163, 91 (1958).

Priv.-Doz. Dr. Dr. D. Stamm
8000 München 23, Kraepelinstr. 10